

### **REMARKS**

In response to the Office Action of July 5, 2007, Claims 1, 3, 8, 9, 22 and 23 have been amended to correct minor informalities and to more clearly define the invention as claimed. Claim 24 and 25 have been added. Support for amended claims 1, 3, 22 and 23 and added claims 24 and 25 can be found in the specification and claims as filed, at least at page 5, line 2, page 11, lines 5-24, page 34, lines 1-20, page 33 and Table 1 for the gelatinization temperatures. No new matter has been added herewith. As a result of the amendments, claims 1-12 and 18-25 are presented for further examination.

### **Supplemental IDS**

A supplemental IDS is included with this response including Zhang et al. Journal of Zhenzhou Institute of Technology and EP0875585 (from India)

### **Rejection under 35 USC §112, second paragraph**

Claims 8-9 were rejected as indefinite because of the term “derived from.” As suggested by the examiner, Claims 8 and 9 have been amended to read “obtained from,” thus, rendering the claims definite.

### **Rejection under 35 USC §103(a)**

Claims 1, 3, 10, 19 and 21 were rejected under 35 USC §103(a) as unpatentable over Kohmoto et al. (Bifidobacteria Microflora 7(2), 61-69 (1988) taken with Tomimura (EP 0405283).

The office action states that it would have been obvious to “make an isomalto-oligosaccharide composition (i.e., Isomalto-900 from cornstarch as taught by Kohmoto et al. using  $\alpha$ -amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase, where a maltogenic enzyme (e.g., alpha-amylase) and pullulanase act on corn starch to produce maltose (see Table III) in the mixture because Tomimura indicates pullulanase in conjunction with a maltogenic enzyme would increase maltose content.”

First Applicants would like to clarify with the Examiner that a pullulanase is a debranching enzyme. It is not a maltogenic enzyme, a starch liquefying enzyme, or a transglucosidic enzyme. Thus, the fact that any of the cited references discusses the use of a pullulanase is has nothing to do with the claimed invention.

The claimed invention is a process of making an isomalto grain composition using insoluble starch substrate at a temperature 0-30°C below the gelatinization temperature of the starch and using a mixture of a maltogenic enzyme, a starch liquefying enzyme and a transglucosidase. Thus, a granular

(insoluble) starch is treated with these enzymes below the gelatinization temperature. Typical processes used previously always included the step of jet cooking (temperatures above the gelatinization temperature) during the process. However, the presently claimed invention does not use jet cooking to produce isomalto-oligosaccharides from a granular starch. As discussed in the specification, an “ungelatinized grain containing a starch” is “not subjected to temperatures greater than the starch gelatinization temperatures” (see page 11, lines 20-25) and can also be called a “granular starch” (see page 11, lines 16-18).

The law is clear that three basic criteria must be met to establish a *prima facie* case of obviousness: (MPEP ¶2143):

First there must be some suggestion or motivation, either in the references themselves or in the knowledge generally available to one of ordinary skill in the art, to modify the reference or to combine reference teachings. Second, there must be a reasonable expectation of success. Finally, the prior art reference (or references when combined) must teach or suggest all the claim limitations. The teaching or suggestion to make the claimed combination and the reasonable expectation of success must both be found in the prior art, not in applicant's disclosure (*In re Vaeck*, 947 F.2d 488, 20 USPQ2d 1440 (Fed. Cir. 1991).

Failure to establish any one of these three requirements precludes a finding of a *prima facie* case and, without more, entitles Applicant to allowance of the claims at issue.

Kohmoto et al (Kohmoto) in combination with Tomimura et al (Tomimura) do not teach all of the claim elements.

Kohmoto et al. studies the effect of isomalto-oligosaccharides on human fecal flora. As part of their study they prepare “Isomalto-900” from cornstarch (see first paragraph under materials and methods in Kohmoto et al) and refer to reference 16 for the method of preparation. Reference 16 is enclosed as Appendix A Yasuda et al. Patent application JP60053017. Yasuda uses a typical method to produce the branched oligosaccharide syrup. The cornstarch is treated with the alpha amylase and jet cooked ( see 100-110°C on page 544, column 1 second paragraph, line 7). Thus, Kohmoto uses a purified starch, cornstarch which is not a granular starch and Kohmoto uses jet cooking to produce the Isomalto-oligosaccharides. As such, Kohmoto does not teach all of the claim limitations, because Kohmoto does not teach an “ungelatinized grain” only cornstarch and Kohmoto does not teach that “steps (a) and step (b) occur at a temperature less than or at a starch gelatinization temperature.”

Tomimura et al (EP 0405283) does not provide the missing claim elements, because Tomimura et al. does not teach the use of an “ungelatinized grain”, but only a “a D.E. starch hydrolyzate.” – a hydrolyzed starch (see page 7 last paragraph of Tomimura). A “hydrolyzate” is a hydrolyzed starch. Thus, Tomimura contacts the hydrolyzate (already hydrolyzed starch) with the enzymes. As such, Tomimura does not teach or suggest contacting a granular starch with the enzymes to produce an isomalto-oligosaccharide. Further, since the starch used in Tomimura is already hydrolyzed, Tomimura does not teach that “steps (a) and step (b) occur at a temperature less than or at a starch gelatinization temperature.”

Thus, Kohmoto in combination with Tomimura fail to teach the process of contacting a granular starch with the enzymes at a temperature below the starch gelatinization temperature to produce isomalto-oligosaccharides. Because the references do not teach all of the claim elements, Applicants respectfully request withdrawal of the rejection under 35 USC§103(a).

If the Examiner believes a telephone conference would expedite prosecution of this application, please telephone the undersigned at the number listed below.

Respectfully submitted,  
/Jennifer A. Haynes/

Date: December 5, 2007

Jennifer A. Haynes, Ph.D.  
Agent for Applicants  
Registration No. 48,868

Genencor Division, Danisco US, Inc.  
925 Page Mill Road  
Palo Alto, CA 94304  
**Tel. 650-846-7595**  
Fax: 650-845-6504

## APPENDIX A

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **61212296 A**

(43) Date of publication of application: **20.09.1986**

(51) Int. Cl. **C12P 19/16**

(21) Application number: **60053017**

(22) Date of filing: **15.03.1985**

(71) Applicant: **SHOWA SANGYO KK**

(72) Inventor: **YASUDA EIHACHIROU**

**TAKAKU HAJIME**

**MATSUMOTO HIROSHI**

## (54) **PRODUCTION OF BRANCHED OLIGOSACCHARIDE SYRUP**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain industrially branched oligosaccharide having preventing effect on dental caries, by treating a specific starch hydrolyzate as a substrate with a transglycosylase.

CONSTITUTION: Starch is treated with  $\alpha$ -amylase

and a debranching enzyme to give a starch hydrolyzate having 40W50 DE (dexrose equivalent) and  $\geq 20$ wt% solid content, which is used as a substrate. The hydrolyzate is treated with a transglycosylase [ $\alpha$ -glucosidase (EC 3,2,1,20) of *Aspergillus niger* system], to give a branched oligosaccharide in a solution. Optionally, saccharides except glucose and the branched oligosaccharide are separated and removed.

COPYRIGHT: (C)1986,JPO&Japio

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-212296

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)9月20日

C 12 P 19/16

8515-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑬ 発明の名称 分岐オリゴ糖シラップの製造法

⑭ 特 願 昭60-53017

⑮ 出 願 昭60(1985)3月15日

⑯ 発 明 者 安 田 栄 八 郎 東京都豊島区要町1-48-35  
 ⑯ 発 明 者 高 久 肇 茨城県鹿島郡神栖町息栖2821 昭産神栖社宅1-308  
 ⑯ 発 明 者 松 本 宏 茨城県鹿島郡神栖町息栖2821 昭産神栖社宅2-209  
 ⑰ 出 願 人 昭和産業株式会社 東京都千代田区内神田2丁目2番1号  
 ⑱ 代 理 人 弁理士 新 井 力 外2名

## 明 細 書

1. 発明の名称 分岐オリゴ糖シラップの製造法

2. 特許請求の範囲

1. 澱粉に $\alpha$ -アミラーゼ及び澱粉枝切酵素を作用させて得たDE(ブドウ糖当量)40~50、かつ固形物濃度20%以上の澱粉加水分解物を基質とし、これに糖類の転位作用を有する酵素を作用させて分岐オリゴ糖を生成させたのち、必要により更に分岐オリゴ糖以外の糖類を分離・除去することを特徴とする分岐オリゴ糖シラップの製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は甘味料、特にう蝕防止効果のある甘味料として用いられる、分岐オリゴ糖を多量に含むシラップの製造法に関するものである。

(従来の技術)

最近、虫歯予防などの見地から砂糖などの甘味料は敬遠される傾向にあり、それに代わる甘味料のひとつとして、イソマルトースやパノースなど

の $\alpha$ -1, 6結合を有する、いわゆる分岐オリゴ糖が注目され始めている。従来よりイソマルトースやパノースは非発酵性糖と呼ばれ、酒造関係では酒のコクを増す成分として重視されてきた。このような糖類は、今後更に進行すると思われ、食品嗜好の多様化、ファッション化に伴い、大きな需要が予想されるものである。

しかし、これら分岐オリゴ糖を工業的、かつ経済的に大量生産する方法はまだ確立されておらず、イソマルトースが高価な試薬として販売されているに留まり、食品等に利用されるには至っていない。

従来、分岐オリゴ糖の製造法としては、たとえば $\alpha$ -1, 6結合を多く有するブルラン、デキストラン等の高分子多糖類を基質とし、これを適宜の酵素または酸類などで加水分解したのち、分子分画クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ等で分画する方法が試みられている。しかしながらブルラン、デキストラン等は非常に高価であるため、この方法は工業的生産には不適當であ

る。

また従来ぶどう糖の製造過程で、グルコアミラーゼ等が糖化作用とともにぶどう糖の逆合成反応を起こし、少量のイソマルトース、パノースほかの分岐オリゴ糖を生成させることが知られている。その生成量は糖固形分に対し通常およそ5%前後であるが、ぶどう糖製造という目的からはこのような分岐オリゴ糖の生成はこのましくないので、その生成を極力抑える努力が払われてきた。

また、澱粉を酸により高温下で加水分解したとき、逆合成反応が生じて $\alpha$ -1, 6結合をもつ糖の生成することが知られている。しかし、この場合分岐オリゴ糖への転化率は極めて低く、しかも極めて過酷な条件下のため副反応による生成物も多いので、この方法を分岐オリゴ糖の製造法として実用的に採用しうる可能性は殆どない。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、上記の通り分岐オリゴ糖の工業的製造法が未確立の現状において、う蝕防止効果のある分岐オリゴ糖の有用性に鑑み、分岐オリゴ糖の

工業的製造法を提供せんとするものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、分岐オリゴ糖の工業的製造法につき検討を重ねた結果、酵素転位反応に基づく極めて経済的な方法を見出した。

本発明は、澱粉に $\alpha$ -アミラーゼと枝切酵素を作用させて得た、DE(ブドウ糖当量) 40~50、かつ固形分20%以上の澱粉部分加水分解物を基質とし、これに糖転位酵素を作用させて分岐オリゴ糖を生成させ、必要により更に適宜の方法でグルコース及び分岐オリゴ糖以外の糖類を分離・除去するものである。

本発明に用いる基質糖液は、澱粉に $\alpha$ -アミラーゼと枝切酵素を作用させて得た、DE40~50、かつ固形分20%以上の澱粉加水分解物である。このようなDE、固形分濃度をもつ澱粉加水分解物は他の酵素、たとえばグルコアミラーゼなどを用いても得られるが、分岐オリゴ糖の収率の点では本発明での酵素の組み合わせに及ばない。又、固形分濃度、DE等についても、本発明の数値範囲の外で

は工業的製造法としての有利性を発揮できず、適当でない。

このような基質糖液の製法の一例を示すなら、pH5.5~7.0に調整した20~40%(w/w)の澱粉スラリーに、細菌液化型 $\alpha$ -アミラーゼ(たとえばノボ社製 ターマミル60L)を0.03~0.15%

(w/w)添加し、100~110℃で3~15分液[*temp*]化した後、更に同じ酵素を0.1~0.4%(w/w)添加して95~100℃で8~24時間反応させ、次でこれに枝切酵素、たとえばイソアミラーゼ(EC3,2,1,68)、プルラーゼ(EC3,2,1,41)、アミロー1, 6-グルコシダーゼ(EC3,2,1,33)等を単独または複合的に作用させることにより、得られる。この基質糖液はDEがおおよそ40~50の間にあり、固形分のうちグルコース(DP1)分は20%以下であって、しかもグルコース重合度の比較的高い成分を多く含み、糖転位酵素を作用させる基質として最適である。分岐オリゴ糖の製造に際し、このような基質を用いた例はこれまでになく、本発明が最初である。

このような基質に、糖転位作用を有する酵素、たとえばアスベルギルス・ニガー系の $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC3,2,1,20) 0.03~1.0 IU/g基質をpH4.0~7.5温度50~65℃で作用させ、液中に分岐オリゴ糖を生成させる。その他の糖転位酵素を用いる場合は、それぞれの酵素が通常使用される反応条件に従えばよい。

この方法によれば、糖転位酵素を作用させる基質としてたとえばマルトース水溶液を用いた場合に比べ、グルコース重合度の比較的高い糖類を多く含む水溶液を基質とするので、グルコース含量が少なく、かつ分岐オリゴ糖含量の高いシラップを得ることができる。また、シラップ中の分岐オリゴ糖の組成はグルコース重合度3以上のものを比較的多く含み、この点でもマルトースを基質とするものにくらべて特異である。シラップ中に含まれる分岐オリゴ糖は主として $\alpha$ -1, 6結合を有するものであるが、ほかに $\alpha$ -1, 2結合、 $\alpha$ -1, 3結合をもつものも少量含まれており、特徴ある製品となっている。

このようにして得られた糖液は、そのまま分岐オリゴ糖シラップとして利用できるほか、必要により更に処理して高濃度の分岐オリゴ糖シラップとすることもできる。そのための方法としては、たとえば次のようなものが挙げられる。

- (1) 糖液に食塩を添加して、ぶどう糖-食塩の複塩結晶を晶出させ、これを除去する方法。
- (2) 糖液にアルコール類、アセトン等の有機溶媒を添加し、分岐オリゴ糖以外の糖類を沈澱、除去する方法。
- (3) 活性炭カラム、ゲルろ過等の分子分画クロマトグラフィ、またはイオン交換体によるイオン交換クロマトグラフィを用いて、分岐オリゴ糖以外の糖類を除去する方法。
- (4) 糖液に酵母を作用させ、分岐オリゴ糖以外の糖類を資化させる方法。

(実施例)

#### 実施例 1

35% (w/w) コーンスターチ水溶液を pH6.3 に調整し、耐熱性  $\alpha$ -アミラーゼ (ノボ社製 ターマミル 60L) 0.12% (w/w) を添加して 105℃ で 10 分間反応させたのち、更に同じ酵素 0.3% を添加して 96℃ で 14 時間反応させた。次でこの反応液を 60℃ に冷却して pH5.3 に調整し、プルラーゼ (ノボ社製 プロモザイム 200 L) を 1.0% 添加して 60℃ で 24 時間反応させたのち、この糖液にアスペルギルス・ニガー系の  $\alpha$ -グルコシダーゼを 0.5 IU/g 基質添加して 55℃ で 48 時間保持し、以下の組成をもつ分岐オリゴ糖シラップを得た。

DP <sub>1</sub>	DP <sub>2</sub>	DP <sub>3</sub>	DP <sub>4</sub> +	分岐オリゴ糖
33.6	24.1 { G <sub>2</sub> 3.1 I G <sub>2</sub> 21.1	30.6	11.7	63.4 (%)

DP はブドウ糖の重合度を表す。  
 DP<sub>1</sub> : 単糖類 (ブドウ糖), DP<sub>2</sub> : 2 糖類  
 DP<sub>3</sub> : 3 糖類, DP<sub>4</sub> + : 4 糖類以上  
 G<sub>2</sub> : マルトース, I G : イソマルトース

#### 実施例 2

実施例 1 で得た分岐オリゴ糖シラップを活性炭で脱色し、更にイオン精製して 60% まで濃縮したのち、スチレン系強酸性の Na 型陽イオン交換樹脂 (ダイヤイオン SK-1B) を充填したカラムを用いた排除クロマトグラフィによって DP<sub>1</sub> を主とした画分を除去して、次の組成をもつ高純度分岐オリゴ糖シラップを得た。

DP <sub>1</sub>	DP <sub>2</sub>	DP <sub>3</sub>	DP <sub>4</sub> +	分岐オリゴ糖
0.9	35.4 { G <sub>2</sub> 4.4 I G <sub>2</sub> 31.0	46.1	17.6	94.7 (%)

DP<sub>1</sub>, DP<sub>2</sub>, DP<sub>3</sub>, DP<sub>4</sub> +, G<sub>1</sub>, I G<sub>2</sub> は前記と同一意義を有す。

カラム : 50mm  $\phi$   $\times$  1000mm h (ただし樹脂高 700 mm)  
 ジャケット付 (70℃)  
 充填物 : ダイヤイオン SK-1B (Na 型)  
 負荷糖量 : 60g (乾物)  
 流速 : SV = 0.08 hr<sup>-1</sup>

(発明の効果)

以上の通り、本発明方法は分岐オリゴ糖の含有率の高いシラップを工業的に製造する実用的方法を提供する。

このようにして得られる分岐オリゴ糖シラップは、さわやかな甘味を有するので、種々の食品の甘味料あるいは風味改良剤として多方面の用途がある。そのうえ、う蝕防止効果があるので、虫歯予防を目的とする甘味料としても広く利用しうるものである。この他分岐オリゴ糖には糖類の晶出抑制効果があるため、砂糖、ぶどう糖、異性化糖、マルトース等の糖液に少量添加することにより、晶出防止剤としても利用できる。

特許出願人 昭和産業株式会社

代理人 新井 力 (ほか 2 名)